

| | |
|-------------|---|
| 氏 名 | 王 麗楊 |
| 学 位 の 種 類 | 博士 (薬学) |
| 学 位 記 番 号 | 博甲第 763 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 17 年 9 月 30 日 |
| 学位授与の要件 | 課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項) |
| 学位授与の題目 | 軟骨組織におけるグルタミン酸シグナリング機構に関する分子薬理学的研究 |
| 論文審査委員 (主査) | 米田 幸雄 (自然科学研究科・教授) |
| 論文審査委員 (副査) | 横井 毅 (医学系研究科・教授), 谷浦 秀夫 (自然科学研究科・助教授), 山田 清文 (自然科学研究科・教授), 田熊 一敏 (自然科学研究科・助教授) |

Glutamate (Glu), which is highly expressed in the mammalian central nervous system for excitatory neurotransmission. In this study, we have demonstrated the inhibit role of Glu on chondrocytes differentiation during endochondral ossification using cultured rat costal chondrocytes and mouse metatarsal organ culture system. We found the functional expression of certain subtypes of VGLUT, GluT and particular ionotropic (iGluR) and metabotropic (mGluR) GluR in both culture system. In addition to We also demonstrated the release of endogenous glutamate by activation of DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionate (AMPA) receptors in primary chondrocytes. As a result, Glu could at least in part modulate cellular proliferation and/or differentiation through group III mGluR subtype functionally expressed in cultured cartilage, while Glu alone may be induced chondrocytes apoptosis in proliferating and hypertrophic zone by Cys-Glu antiporter (Xc⁻ system) during endochondral ossification. In agreement with our previous studies on functional expression of glutamate (Glu) signaling system in cultured rat calvarial osteoblasts, emerging evidence that Glu may be one of the endogenous factors acting as a paracrine and/or autocrine substance via Glu receptors (GluR) and Glu transporters (GluT) in bone.

グルタミン酸 (Glu) は、記憶、視覚、痛覚など、多数の脳の機能において重要な役割を果たす脳の主要な興奮性神経伝達物質である。一方、Glu は情報物質としてだけでなく、エネルギー源やあるいは蛋白質成分として利用されるため、私たちの生体内では脳以外にも殆ど全ての組織に Glu は見出される。私たちは脳以外の組織にも、GluR が存在する可能性を世界に先駆けて報告してきた。最近では骨組織における Glu シグナリング分子の重要性を提唱しているが、Glu に対する軟骨組織や骨膜組織などの骨関節系における研究は世界的にも皆無の状況である。したが

って本研究では軟骨及び内軟骨骨化における Glu シグナルの可能性について検討した。

本研究で使用する妊娠 15.5 日目の ddY マウス胎児由来中足骨では、血管の侵入や、あるいは破骨細胞や骨芽細胞の侵入がまだ起こっていないため内軟骨骨化における軟骨分化を中心に検討できる。また、中足骨は成長軟骨板として空間的に生体に近く、各種軟骨が特異的な細胞外基質を産生し、静止軟骨から増殖軟骨を介し肥大軟骨へさらには最後石灰化軟骨細胞までの順で成長している。しかしながら、中足骨は定量化実験をしにくい欠点があるため初代培養軟骨細胞を用いた実験も併用した。

本研究では、マウス胎児由来培養中足骨に対する高濃度 Glu 添加が中足骨石灰化抑制及び増殖層や肥大化層軟骨細胞に特異的に細胞死誘導する可能性が見出された。さらに初代培養軟骨細胞における Alcian blue 染色性並びに ALP 活性の顕著的な減少や、比較的未成熟な段階における著明な軟骨細胞死が誘発されたことも認められた。一方、培養軟骨組織には GLAST、GLT-1 及び EAAC 1 の恒常的な mRNA 発現が認められ、GLT-1 蛋白質を介する機能的 $[^3\text{H}]$ Glu 取り込み機構が発現しており、さらに EAATs は Glu の中足骨石灰化抑制、細胞死誘導作用に防御的に働いた。

初代培養軟骨においては、VGLUT1 と AMPA レセプターサブユニットである GluR3 の恒常的な mRNA 発現が確認しており、AMPA/CTZ 刺激に伴い内在性 Glu の遊離が上昇した。実際、骨組織における正確な Glu の濃度は不明であるが、血漿中には数 $10\text{ }\mu\text{M}$ の Glu が存在することが知られており、軟骨組織は以前から無血管で神経支配を受けられず、栄養は拡散のみに依存することが定説となっているため、今回観察された軟骨細胞死や軟骨成長抑制が、実際生体内で起こりうる濃度であるとは言い難い。しかしながら、骨組織に Glu 作動性神経が侵入しているという報告もあり、Glu は中枢神経系だけでなく、全身的に働く可能性が考えられる。本研究の結果より、軟骨細胞において Glu シグナル機構を構成する際に必要となる放出機構及び終止する機構が発現している可能性が示されたことから、軟骨細胞自身によるオートクライン或いはパラクライン因子として Glu が細胞に暴露される可能性は十分考えられる。

Cys-Glu antiporter (Xc^- 系) は細胞内の Glu を細胞外に排出し、細胞外の cystine を細胞内に取り込む系であり、高濃度 Glu が細胞外に存在することでその機能は失われ、GSH の基質である L-Cys 合成が抑制される。一方、活性酸素種 ROS は種々の条件下で生体内に発生し、酸化ストレスとしてタンパク質、脂質、核酸を酸化修飾する。ROS は細胞内小器官を傷害し、直接アポトーシスへと向かうシグ

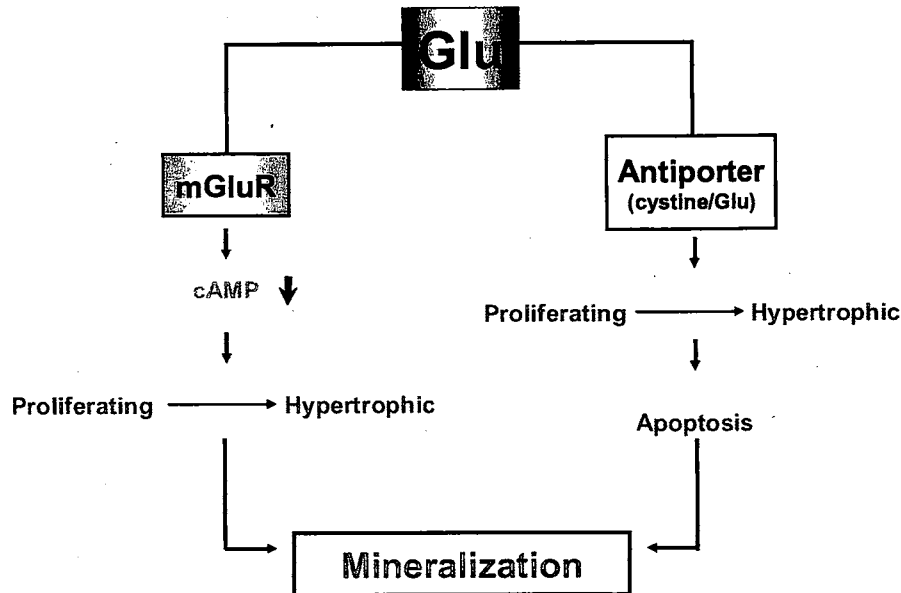
ナルを活性化する。グルタチオンは、ラジカルの捕捉、酸化還元による細胞機能の調節、各種酵素の SH 供与体であり、抗酸化成分としても知られる。GSH は、活性酸素（スーパーオキシド、過酸化水素など）と反応して、安定なグルタチオンラジカルを形成し、2 量体化に変化する。軟骨組織において細胞外に高濃度 Glu 暴露すると、Cys/Glu antiporter の正常機能が失われるか或いは逆作動し、細胞成長に必要な GSH 量が合成不能に陥り、酸化ストレスより細胞死が引き起こされる可能性が確認できた。

しかしながら、Glu 暴露による中足骨の石灰化抑制或いは初代培養軟骨細胞における細胞分化、成熟阻害作用には細胞死誘導とは別のメカニズムが存在する可能性が示唆された。結果として、Glu が軟骨組織に発現している mGluR を介する軟骨石灰化抑制作用を発揮し、特にそのうちⅢ型 mGluRs が関与する可能性が示唆された。

以上のように軟骨組織には Glu トランスポーター、iGluR、mGluR、及び VGLUT など中枢神経系における Glu シグナリングに必要なすべての分子機構を持ち合わせているものと思われる。さらに軟骨組織には Xc^- 系のように、高濃度 Glu による酸化ストレスの毒性を防御するメカニズムが備わっている可能性が示唆された。したがって、Glu は中枢神経系においては興奮性神経伝達物質として、さらに骨組織においては Glu 作動性神経由来に加え、オートクライン或いはパラクライン因子として、生体内ホメオスタシスの維持機構に二重の役割を果たしているものと思われる。

私たちは、骨粗鬆症をはじめとする代謝性骨疾患の発症原因の解明研究や、治療方法開発研究のうえでも、Glu は極めて大きな病態生理学的意義を持つと考えている。同じように、慢性関節リュウマチや変形性関節症などの発症にも、Glu 信号異常が関係する可能性が考えられる。

Hypothesis



学位論文審査結果の要旨

本研究では、脳内の興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸（Glu）シグナル伝達機構が、軟骨組織に機能的発現する可能性を ex vivo および in vitro 実験系を用いて探索した。

In situ hybridization 法によるマーカー遺伝子発現解析の結果、器官培養マウス中足骨では生体における成長軟骨板の場合と同様に、特定部位に異なる分化段階の軟骨細胞の局在が認められた。高濃度 Glu 添加条件下で中足骨を培養すると、石灰化の著明な抑制とともに特定軟骨細胞に細胞死が誘導された。Glu 曝露条件下では、ラット肋軟骨由来初代培養軟骨細胞の成熟阻害だけでなく、細胞生存率低下と Hoechst 33342 染色陽性細胞数の著明な増加が出現した。RT-PCR 解析の結果、マウス中足骨およびラット軟骨細胞ともに、Glu 輸送分子として興奮性アミノ酸トランスポーターとシスチン/Glu アンチポーター（Xc⁻）が発現する事実が見出された。中足骨では Glu による石灰化抑制と細胞死誘導はともに、還元型グルタチオン（GSH）やシスチンの添加により有意に回復したが、GSH 枯渇薬や GSH 合成阻害薬は逆に著明な細胞死を誘導した。培養軟骨細胞には機能的な [³H] Glu 取り込み活性だけでなく、高濃度 Glu 曝露に伴う細胞内 GSH 濃度低下が観察された。さらに、中足骨と軟骨細胞の両方において、高濃度 Glu 曝露は活性酸素種を著しく発生させることが判明した。

以上の研究成績は、軟骨組織における Glu シグナリング機構発現に関する先駆的報告であるのみならず、慢性関節リウマチなどの軟骨細胞破壊性疾患に対する新規治療戦略の糸口となることが期待される点で高く評価されるので、審査委員会は本論文が博士（薬学）に値すると判断する。